



PCT/JP99/04129

4

30.08.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年 7月30日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第216094号

出願人

Applicant (s):

東燃株式会社

PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年10月 1日

特許長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆


出証番号 出証特平11-3065790

【書類名】 特許願

【整理番号】 983849

【提出日】 平成10年 7月30日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 G12N 33/576

【発明の名称】 C型肝炎ウイルスの測定方法

【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式
会社 総合研究所内

【氏名】 青柳 克己

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式
会社 総合研究所内

【氏名】 大植 千春

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式
会社 総合研究所内

【氏名】 飯田 久美子

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式
会社 総合研究所内

【氏名】 八木 慎太郎

【特許出願人】

【識別番号】 390022998

【氏名又は名称】 東燃株式会社

【代理人】

【識別番号】 100077517

【弁理士】

【氏名又は名称】 石田 敏

【電話番号】 03-5470-1900

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871

【弁理士】

【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100088269

【弁理士】

【氏名又は名称】 戸田 利雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9714669

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 C型肝炎ウイルスの測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 C型肝炎ウイルス（HCV）の測定方法において、炭素原子数10個以上のアルキル基と第2～第4級アミンとを有する界面活性剤もしくは非イオン界面活性剤、又はこの両者の存在下で、HCVコア抗原をそのプローブとの結合により測定することを特徴とする方法。

【請求項2】 前記アルキル基と第2～第4級アミンとを有する界面活性剤が、炭素原子数12～16個のアルキル基と第3級又は第4級アミンとを有する界面活性剤である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記第3級又は第4級アミン界面活性剤が、ドデシル-N-サルコシン酸、セチルもしくはドデシルトリメチルアンモニウム塩、3-(ドデシルジメチルアンモニオ)-1-プロパンスルホン酸、ドデシルビリミジウム塩、又はデカノイル-N-メチルグルカミド(MEGA-10)である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 前記非イオン性界面活性剤が、12～14の親水疎水比(HLB)を有する界面活性剤である、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 前記非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンイソオクチルフェニルテーテル、又はポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルである請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 C型肝炎ウイルス（HCV）の測定方法において、請求項1～5に記載の方法によるHCVコア抗原の測定と共に、抗HCV抗体を、そのプローブとの結合により測定することを特徴とする方法。

【請求項7】 前記抗HCV抗体のためのプローブが、HCV関連ポリペプチドである、請求項6に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、C型肝炎ウイルス（HCV）の検出方法に関し、さらに詳しくは、

HCVコア抗原を測定するか、又はHCVコア抗原とHCVコア抗体を同時に測定するための方法に関する。この方法は多数の血液試料等のスクリーニングのために特に有効である。

【0002】

【従来の技術】

HCV (C型肝炎ウイルス) の感染によって引き起こされる肝炎は、高い頻度で慢性化し、感染期間が長期化するにつれ、肝硬変、肝ガンとしばしば移行する。しかしながらHCVの感染は、主に血液および血液由来成分によってもたらせることから、感染源を特定し、排除することにより感染経路を遮断することが可能である。現在感染源を特定する方法としては、主にHCVポリペプチドに対する抗体を検出する方法が採られているが、より高い精度で感染源を特定できる方法が求められていた。

【0003】

求められる背景としては、HCV感染後、抗原は存在するが抗体が産生されない、いわゆるウインドビリオド (Window period) と呼ばれる時期が存在することにある。この期間にある血清は、抗体検査により感染の有無を判別することができない。抗体検査ではウインドビリオド期にある検体を排除できないため、抗体検査によりスクリーニングを行っている輸血や血液成分、血液製剤などの血液由来物質を利用する場合は、ウインドビリオドにある検体による二次感染の危険性が存在している。そのためHCVポリペプチドに対する抗体ではなく、HCVそのもの、つまりHCVパーティクルを検出する必要があった。

【0004】

HCVそのものを検出、測定することは、HCVパーティクルを構成している抗原または遺伝子 (RNA) を検出することにより可能となる。ここでHCVパーティクルを構成している抗原は、コア抗原、エンベロープ抗原 (E 1, E 2) であると考えられている。

このうちエンベロープ抗原は、超可変領域 (Hyper Variable Region) に代表されるように、抗原性の高い領域で変異が多い。また遺伝子型間での違いも報告されている。これらの変異、違いを全て検出するためには、複数の領域に特異的

に結合するプローブを用いる必要がある。

【0005】

なおここでプローブとは、抗原に特異的に結合する分子、たとえばレセプター、抗体、組換え抗体、機能性分子、または機能性構造物の様に、抗原分子を認識し結合するものをいう。

一方コア抗原はアミノ酸配列レベルで配列が保存されており、領域を選択することにより、複数種類の遺伝子型が報告されているHCVのいずれの遺伝子型の抗原も検出できるプローブを得ることが出来るため、遺伝子型に依存しない検出方法を構築することが可能となる。

【0006】

しかしながら抗原を検出する系を構築するためには留意しなければならない点がある。すなわち、被験者である検体中には抗体が存在する可能性が高く、これらの抗体が、抗原を検出するためのプローブと結合部位を競合し、プローブの結合を阻害することにより抗原の検出感度を下げる。そのため抗原を効率良く検出するためには、抗体の結合しない領域もしくは抗体の結合によりプローブの結合が干渉されない領域を認識するプローブを用いる方法が考えられる。しかしながら、HCVコア抗原のように複数の抗体結合部位が報告されている分子において、前述の条件をみたすプローブを作成することは困難である。

【0007】

そのため抗原分子を検出するためには、プローブの結合を阻害する抗体を除く必要がある。除く方法としては、物理的な原理に従って除く方法、例えば分子量の違いを利用して、HCVパーティクルと抗体とを分離分別する方法がある。この例として、ゲルfiltration、超遠心分離法、密度勾配遠心分離法、限外濾過膜等の膜を利用した分子量分画法がある。しかししばしば抗体は、他の生体高分子と複合体を形成し高分子量に変化するため、物理的な原則にしたがった方法では、HCVパーティクルとの分別が困難になる。またこれらの方法は、処理行程に特殊な機器を用いることなどから、血液のスクリーニングなどのマススクリーニングに適用することは困難である。

【0008】

一方生化学的な原理に基づいた方法、例えばPEG（ポリエチレンギリコール）などの水環境を変化させることにより、HCVパーティクルと他の血清成分との化学的性質の違い、例えば水に対する溶解性の違いを利用してHCVパーティクルを優先的に沈澱させることにより分別する方法もあるが、抗体または抗体複合体はしばしばパーティクルと同様の分画に沈澱し、分画すること自体が困難となる。またHCVパーティクルは、しばしばHCVパーティクルを構成している抗原とそれを認識する抗体との免疫複合体を形成しており、免疫複合体から抗体または抗原のみを分離することは困難である。

【0009】

そのためプローブの機能を阻害する物質（抗体など）を機能的に破壊することにより除く方法がとられる。抗体の機能を失わせる方法としては、タンパク質を変性させる条件に露呈させることにより抗体タンパク質を変性させる方法が考えられるが、ここで重要なことは抗体の機能は失わせるが、目的とする抗原の機能、つまりプローブと結合する機能、すなわちプローブが抗体の場合にはエピトープを消失させない、またはエピトープを再提示させる条件である。

HCVの感染の有無を判別する方法に求められる機能は、その目的により異なる。

【0010】

抗体検査は検体中にHCVに対する抗体が存在するか否かを判別する方法であるが、検体中にHCVに対する抗体が存在した場合、その検体の供与者が現在HCVに感染しており検体中にHCVが存在している場合もあれば、すでに治療または自然治癒によりHCVが体内から排除されている場合もあり、抗体の有無によりこれらを区別することは困難である。

抗原検査は、HCVが検体中に存在しているか否か、または存在している場合にはその量の多寡を知らせることが重要な機能であり、その際に抗体が存在しているか否かは問題とならない。

【0011】

治療の際には、肝炎がHCVを主たる原因とするか否かを決定するために、HCVの抗体検査が重要な情報を与えるが、最終的にはHCVの抗原の有無が確定

診断には求められる。また治療効果判定には、HCVが体内から排除されているか否かを判定することが重要であり、判定には抗原の量の多寡を知ることが重要である。すなわち抗体の有無に関係なく抗原の有無、その量を知ることが治療に重要である。すなわち治療においては、抗原の有無とその量を与える検査方法がもっとも重要な方法である。

【0012】

一方血液および血液由来製剤においては、二次感染の抑止がもっとも重要であり、そのためにはHCVの感染源としての危険性の有無を判別することが検査方法に求められる。現在この分野では主たる検査方法として抗体検査が用いられている。

しかしながら前述のように、HCV感染後のウインドピリオドにある血清は、抗体検査により感染の有無を判別することができない。故に、抗体検査によりリスククリーニングを行っている輸血や血液成分、血液製剤などの血液由来物質を利用する場合は、ウインドピリオドにある検体による二次感染の危険性が存在する。

危険性をより軽減させるためには抗原検査の併用が求められるが、献血などの血液検査のようなマススクリーニングでは未だ抗原検査は行われていない。

【0013】

理論的には100%の精度（感度、特異度）で抗原の有無を判定できる検査方法が存在すれば、それを唯一の検査方法とすれば良いが、いかなる検出方法でも検出感度が存在し、検出感度以下のものは測定できない。故に100%の精度で判別できる検査方法は存在しない。また特殊な例においては抗原検査のみでは感染源を逃す可能性が存在し、そのためこの分野においては抗体と抗原の両者を測定することが、二次感染の危険性を軽減させるために必要である。マススクリーニングに適用でき、高い感度、特異性を示す抗原検出方法が用いられるようになった場合、抗原と抗体の両方を測定することが求められるようになり、同一検体数での検査数が現在よりも増加し、コストアップ要因となる。

【0014】

このようなことから、抗原と抗体を同一方法で測定することが可能となれば、当該分野においては検査数の軽減をはかることが出来、多大な効果を与えること

が分かる。

すでに記したように抗体を検出する方法、抗原を検出する方法は開発されているが、前述のごとく抗体を検出する条件では、抗原を検出しようとすると、抗原を検出するプローブの結合を阻害する抗体が存在することにより抗原を効率良く検出できない。一方抗原を検出する条件でも、前述のごとく、抗原の検出を競合阻害する抗体を除く方法がとられることから、抗体を検出できない。それゆえすでに報告されている方法では抗原と抗体を同一方法で検出することはできない。

【0015】

【発明が解決しようとする課題】

血液および血液由来の物質を利用する際の、二次感染軽減の目的においては、感染者、感染既往者を区別する必要はなく、抗体または抗原が存在するか否かを判別できればよい。すなわち本発明は、ウインドピリオド期のように抗体の存在しない時期の検体では抗原を検出し、抗体の存在する時期の検体では抗原を、又は抗原と抗体を検出する方法を提供することにより、血液および血液由来物質の検査に求められる新しい検査方法を提供する。

【0016】

【課題を解決するための手段】

上記の課題を解決するため、本発明は、C型肝炎ウイルス（HCV）の測定方法において、アルキル基と第2～第4級アミンとを有する界面活性剤もしくは非イオン界面活性剤、又はこの両者の存在下で、HCVコア抗原をそのプローブとの結合により測定することを特徴とする方法を提供する。

本発明はさらに、上記の方法によるHCVコア抗原と測定と共に、HCVコア抗体を、そのプローブとの結合により測定することを特徴とする方法を提供する。

【0017】

【発明の実施の形態】

本発明の提供するHCV感染検出方法は、ウインドピリオド期のように抗体の存在しない時期の検体では抗原を検出し、抗体の存在する時期は抗原を、又は抗原と抗体の両者を検出する方法である。すなわち抗体の存在しない時期、ウイン

ドピリオド期においては抗体が存在しないため、抗原を検出する際に抗体を除く必要はないことになる。故に抗原を検出するために必要な前処理を行う必要はなくなる。

【0018】

しかしながら、HCVパーティクルに含まれる抗原を検出するためには、検出のために用いるプローブの認識部位を露呈させることが重要である。HCVウイルスパーティクルは、ゲノムである核酸とコア抗原が複合体を形成して粒子を形成し、その粒子を脂質膜とエンベローブタンパク質からなる外膜が覆った構造をしていると考えられている。さらに血液中では低密度リポプロテイン（LDL）やHCVに対する抗体などとの複合体を形成して存在していると考えられている。そのため、血液中に存在するウイルスパーティクルのままでは、プローブはコア抗原を認識し結合することが出来ない。故にコア抗原を検出するためには、コア抗原を取り囲むこれらの構造物を除去するなどの処理をして、コア抗原がプローブに認識されるようにする必要がある。

【0019】

すなわち本発明においては、検体中に含まれるHCVパーティクル中のコア抗原を、コア抗原を認識するためのプローブが認識できるように露呈させる反応条件、反応させる系からなる反応方法、および反応させる系を含む試薬をも提供する。

【0020】

一方抗体が十分に存在している時期においては、前述のごとく、検体中にはプローブの結合部位と競合するコア抗原に対する抗体が存在している場合があるが、その場合にはコア抗原の検出感度が低下する可能性がある。またコア抗原をプローブと結合できるように露呈させた場合には、プローブと競合するコア抗原に対する抗体が含まれた場合、抗体は露呈されたコア抗原に吸収され、抗体を免疫複合体を検出する方法によって検出するための抗原に結合するコア抗原に対する抗体の量が減少し、検出感度が低下する可能性がある。

【0021】

そのため抗体の検出に用いる抗原は、コア抗原のエピトープのみからなるもの

でもよいが、好ましくはコア抗原以外のHCVエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドである。またHCVエピトープを模倣する、HCVエピトープを含むペプチドまたはポリペプチド以外のペプチドまたはポリペプチド、または化合物であってもよい。

ただしコア抗原を検出するためのプローブと、HCVエピトープまたはHCVエピトープを代替する化合物とは、互いに認識しあうことにより結合するものでないことが好ましい。

【0022】

HCVコア抗原のためのプローブとしての抗体又はHCVコア抗原を検出するための標識される抗体は、マウス、ウサギ、ニワトリ、ヤギ、ヒツジ、ウシなどの実験動物を免疫して得られるポリクローナル抗体；免疫した個体から、脾臓細胞を分離し、ミエローマ細胞と融合させることによって得られるハイブリドーマの產生するモノクローナル抗体；または脾臓細胞、血中白血球をEBウイルスによって不死化させた細胞の產生するモノクローナル抗体；HCVに感染しているヒトもしくはチンパンジーなどが產生しているモノクローナル抗体；

【0023】

マウス、ヒトなどのイムノグロブリンのcDNAもしくは染色体DNAから得られる可変領域遺伝子断片、またはイムノグロブリンのcDNAもしくは染色体DNAの一部と人工的に作製した配列とを組み合わせることによって構成される可変領域遺伝子断片、人工的な遺伝子配列を用いて構成される可変領域遺伝子断片またはこれらを材料に遺伝子組換え手法によって作製される可変領域遺伝子断片を、イムノグロブリン定常領域遺伝子断片を組み合わせることによって構成される組換え抗体遺伝子によって形質転換された細胞が產生する組換え抗体；上記の可変領域遺伝子断片と例えばバクテリオファージの構造蛋白質と融合させて作られるファージ抗体；上記の可変領域遺伝子断片を他の適用な遺伝子断片例えばmyc遺伝子の一部などと組み合わせることにより構成される組換え抗体遺伝子によって形質転換された細胞が產生する組換え抗体などである。

【0024】

トリプシン分子に可変領域を人工的に導入することによって產生されるプロ-

ブ、レセプターなどの蛋白質に特異的に結合する分子を人工的に改変することによって得られるプローブ、その他コンビナトリアルケミストリー技術によって作製されたプローブなど、コア抗原に高い特異性、親和性を示す分子であればそれを用いることが出来る。

【0025】

上記のモノクローナル抗体は、当業者により容易に作製することができる。ハイブリドーマによるモノクローナル抗体の作製は良く知られている。例えば、BALB/cマウスなどの腹腔内あるいは皮内に、上記融合ポリペプチドもしくはポリペプチド（以下、本抗原）を単独もしくはBSA、KLHなどと結合させた抗原として、単純あるいはフロイント完全アジュバント等のアジュバントと混合して定期的に免疫する。血中の抗体価が上昇した時点で、追加免疫として本抗原を尾静脈内に投与し、無菌的に脾臓を摘出した後、適当なマウス骨髄腫細胞株と細胞融合し、ハイブリドーマを得る。本方法は、KohlerとMilsteinの方法（Nature 256: 495-497, 1975）に従って行なうことができる。

【0026】

上記方法により得られたハイブリドーマ細胞株を適当な培養液中で培養し、その後、本抗原に対して特異的な反応を示す抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を選択してクローン化する。抗体産生ハイブリドーマのクローニングには限界希釈法のほか軟寒天法（Eur.J.Immunol. 6: 511-519, 1976）などを利用することができる。そして、産生されたモノクローナル抗体をプロテインAなどを用いたカラムクロマトグラフィーなどの方法により精製する。

【0027】

上記のモノクローナル抗体以外にもプローブとして用いる分子は作製することが出来る。例えば組換え抗体についてはHoogenboonの総説などに詳しく記載されている（Trends in Biotechnology, 15: 62-70, 1997）。

本発明において、検体中のHCVコア抗体のためのプローブとしての抗原又は前記HCVコア抗体を製造するための抗原は、具体的には、例えば配列番号：1又は2に示すアミノ酸配列を有するポリペプチド、あるいは配列番号：3～6に記載の複数のアミノ酸配列を含有する融合ポリペプチドであり、これらは、これ

らをコードするDNAの組換え発現により得ることができる。

【0028】

ここで検出原理は、酵素標識抗体方法、蛍光標識方法、ラジオアイソトープ標識方法など通常の免疫測定法に用いられる方法を用いてもよく、酵素標識抗体法における酵素検出原理は、比色法、蛍光法、化学発光法などがある。また抗体の検出には、二抗原サンドイッチ法のような、抗体検出に一般的に用いられる方法を用いてもよく、さらに抗原の検出にも同様に一ステップサンドイッチ系などの方法を用いることも出来る。

【0029】

本発明の様態の一つは、以下のような反応系である。(1) HCVコア抗原に対するプローブ、たとえばHCVコア抗原に対する抗体と、(2) HCVエピトープを含む化合物、たとえばHCVポリペプチドのエピトープを含むペプチド、ペプチド化合物またはポリペプチド、およびこれらの混合物を、免疫測定法に用いられる担体、たとえばミクロタイタープレートに固相化させる。固相化させた担体を、HCVパーティクル、またはパーティクル複合体からHCVコア抗原をプローブが認識できるように露呈させ、かつHCVエピトープに対する抗体の機能を阻害させないような成分を含む反応緩衝液中で、被検体と反応させ、検体中に含まれるコア抗原およびHCVエピトープに対する抗体を担体に特異的に結合させる。

【0030】

次に、結合されなかった検体中の成分を、たとえば担体を適当な緩衝液で洗浄することによって除いた後、担体に結合したコア抗原を認識するプローブたとえばコア抗原に対する酵素などで標識された抗体と、担体に結合したHCVエピトープに対する抗体を認識するプローブ、たとえば酵素などで標識された抗-ヒト抗体マウスモノクローナル抗体を含む反応液と反応させることにより、担体に結合したコア抗原とHCVエピトープに対する抗体に特異的に結合させる。反応終了後、未反応の成分を取り除くため、たとえば担体を適当な緩衝液で洗浄した後、標識を適当な方法で検出することにより、検体中に含まれるコア抗原とHCVエピトープに対する抗体を検出することが可能となる。

またイムノクロマト法などの一般的に免疫検定法に用いることの出来るB/F分離法にも適用可能であることは、当該分野の研究者にとっては自明である。

【0031】

抗原検出に適した反応条件

本発明が提供する系における抗原検出に適した反応系とは、HCV抗原エピトープに対する抗体の機能を失わせない程度のマイルドな条件でありながら、検体中に存在する複雑な構造体であるHCVパーティクルから、HCV抗原を認識するプローブである抗体の認識する領域を十分に露呈させる条件からなる系である。

【0032】

すでに超遠心法にて分離したウイルスパーティクル (Takahashi et al., 1996, J.Gen.viro., 73:667-672)、ポリエチレングリコールによって凝集沈殿させたHCVパーティクルをTwee n 80やTriton X 100の様な非イオン性の界面活性剤によって処理することにより (Kashiwakuma et al., 1996, J.Immunological methods 190:79-89)、コア抗原が検出可能であることが示されているが、前者においてはその検出感度が不十分であり、十分に抗原が露呈されているかは疑問である。また後者においては他の処理剤を加えることにより抗体を失活させており、界面活性剤の効果そのものについては触れられていない。

【0033】

本発明においては、始めに界面活性剤を基本に条件を検討し、反応液を界面活性剤を中心とした組成にすることにより、すでに報告されているHCV抗原検出系のように、遠心操作や加熱などの操作からなる前処理法を適用することなく、単に反応液中で検体を希釈することのみにより、HCVパーティクル中の抗原を効率良く検出することが可能となった。

効果的にウイルス粒子中からコア抗原を抽出し、かつ血清中の様々な物質との相互反応を抑制し、効率よくプローブと抗原とが反応できる条件を与えることが必要である。この際の効果的な界面活性剤としては、アルキル基と第2～第4級アミンを同一分子内に有する界面活性剤、又は非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【0034】

前記アルキル基と第2～第4級アミンを有する界面活性剤において、アルキル基に好ましくは直鎖アルキル基であり、その炭素原子数は好ましくは10個以上、さらに好ましくは12～16個である。アミンとしては第3アミン又は第4アミン（アンモニウム）が好ましい。具体的な界面活性剤としては、ドデシル-N-サルコシン酸、ドデシルトリメチルアンモニウム塩、セチルトリメチルアンモニウム塩、3-(ドデシルジメチルアンモニオ)-1-プロパンスルホン酸、3-(テトラデシルジメチルアンモニオ)-1-プロパンスルホン酸、ドデシルピリミジウム塩、セチルピリミジウム塩、テカノイル-N-メチルグルカミド(MEGA-10)、ドデシル-N-ベタイン等が挙げられる。ドデシル-N-サルコシン酸及びドデシルトリメチルアンモニウム塩が好ましい。

【0035】

前記の非イオン性界面活性剤としては12～14の間の親水疎水比を有するものが好ましく、ポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル類、例えばTriton X100、Triton X114など、あるいはポリオキシエチレンノニファニルエーテル類、例えばNonidet p40, Triton N101, Nikkol NP等が好ましい。

本発明においては、上記2つのタイプの界面活性剤を単独で用いてもよいが、併用するのが一層好ましく、併用により相乗効果が得られる。

【0036】

さらにHCVエピトープに対する抗体を検出するように、HCVエピトープを含む抗原と、HCV抗原を検出するための抗体を固相化した粗体と、本発明が提供する反応液で希釈した検体と反応させることにより、HCV抗体が存在せずHCV抗原を含む検体においては、抗原を効率良く検出し、HCV抗原が存在せず抗体のみが存在する抗体においては効率良く抗体を検出し、さらに抗原と抗体が存在する検体では、抗原と抗体を同時に検出することにより高いシグナルを与えていていることを見いだし、本発明を完成させるに至った。

【0037】

【実施例】

以下実施例によって本発明を詳細に説明する。

実施例1. HCV由来ポリペプチドの発現プラスミドの発現および精製

(A) 発現プラスミドの構築

HCVのコア領域に相当する発現プラスミドは以下の方法で構築した。C11-C21クローンおよびC10-E12クローン(特開平6-38765)をpUC119に組み込んで得られたプラスミドpUC・C11-C21およびpUC・C10-E12の各DNA 1μgを制限酵素反応液20μl [50mM Tris-HCl(pH7.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM NaCl、15単位のEcoRIおよび15単位のClaI酵素]中、および[10mM Tris-HCl(pH7.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、50mM NaCl、15単位のClaIおよび15単位のKpnI酵素]中で各々37℃1時間消化し、その後0.8%アガロースゲル電気泳動を行ない、約380bpのEcoRI-ClaI断片および約920bpのClaI-KpnI断片を精製した。

【0038】

この2つのDNA断片とpUC119をEcoRIおよびKpnIで消化したベクターに10×リガーゼ用緩衝液[660mM Tris-HCl(pH7.5)、66mM MgCl₂、100mMジチオスレトール、1mM ATP]5μl、T4リガーゼ1μl(350単位/μl)に水を加えて50μlとし、16℃で一晩保温し、連結反応を行なった。このプラスミドを用い大腸菌JM109を形質転換させ、プラスミドpUC・C21-E12を得た。

【0039】

このプラスミドpUC・C21-E12 DNA 1ngを2つのプライマー(5'-GAATTTCATGGGCACGAATCCTAAA-3' (配列番号: 7)、5'-TTAGTCCTCCAGAACCCGGAC-3' (配列番号: 8))を用いPCRを行なう。PCRはGeneAmpTM (DNA Amplification Reagent Kit, Perkin Elmer Cetus製) のキットを用いDNA変性95℃1.5分、アニーリング50℃2分、DNA合成70℃3分の条件で行ない、得られたDNA断片を0.8%アガロースゲル電気泳動により分解し、グラスパウダー法(Gene Clean)で精製した。

【0040】

一方、pUC19を制限酵素SmaIで消化し、PCR法によって得られたDNA断片を10×リガーゼ用緩衝液[660mM Tris-HCl(pH7.5)、66mM MgCl₂、100mMジチオスレトール、1mM ATP]5μl、T4リガーゼ1μl(350単位/μl)に水を加えて50μlとし、16℃で一晩保温し、連結反応を行なった。このプラスミドを用い大腸菌JM109を形質転換させ、プラスミドpUC19-C21-E12-SmaIを得た。

【0041】

このプラスミドDNA 1μgを制限酵素反応液20μl[150mM NaCl、6mM Tris-HCl(pH7.5)、6mM MgCl₂、15単位のEcoRIおよび15単位のBamHI酵素]中で37℃1時間消化反応を行ない、その後0.8%アガロースゲル電気泳動を行ない、約490bpのEcoRI-BamHI断片を分離し、これをグラスパウダー法で精製した。

【0042】

次に発現ベクターであるTrp·TrpE(特開平5-84085)のDNA 1μgを制限酵素反応液20μl[150mM NaCl、6mM Tris-HCl(pH7.5)、6mM MgCl₂、15単位のEcoRIおよび15単位のBamHI酵素]中で37℃で1時間消化し、その反応液に水39μlを加え、70℃で5分間熱処理した後にバクテリアアルカリ性ホスファターゼ(BAP)1μl(250単位/μl)を加えて37℃で1時間保温した。

【0043】

この反応液にフェノールを加えてフェノール抽出を行ない、得られた水層をエタノール沈殿し、沈殿物を乾燥した。得られたEcoRI-BamHI処理ベクターDNA 1μgと上述のコア140断片を10×リガーゼ用緩衝液[660mM Tris-HCl(pH7.5)、66mM MgCl₂、100mMジチオスレトール、1mM ATP]5μl、T4リガーゼ1μl(350単位/μl)に水を加えて50μlとし、16℃で一晩保温し、連結反応を行なった。

【0044】

この反応液の10μlを用いて大腸菌HB101株を形質転換した。形質転換

に用いる感受性大腸菌株は塩化カルシウム法 [Mandel, M. と Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159-162 (1970)] により作られる。形質転換大腸菌を $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むLBプレート (1%トリプトン、0.5% NaCl、1.5%寒天) 上に塗布し、37°Cに一晩保温した。プレート上に生じた菌のコロニーを1白金耳取り、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むLB培地に移し、一晩37°Cで培養した。

【0045】

1. 5ml の菌培養液を遠心して集菌し、プラスミドDNAのミニプレバレーションをアルカリ法 [Manniatis ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (1982)] により行なった。得られたプラスミドDNA $1 \mu\text{g}$ を制限酵素反応液 $20 \mu\text{l}$ [150mM NaCl、 6mM Tris-HCl (pH 7.5)、 6mM MgCl₂、15単位のEcoRIおよび15単位のBamHI酵素] 中で37°C、1時間消化し、アガロースゲル電気泳動を行なって、約490bpのEcoRI-BamHI断片が生じるTrp- λ コア160発現プラスミドを選別した。

【0046】

(B) クローンコア160でコードされるポリペプチドの発現および精製
発現プラスミドTrp- λ コア160をもつ大腸菌HB101株を $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む 3ml の2YT培地 (1.6%トリプトン、1%酵母エキス、0.5% NaCl) に接種し、37°Cで9時間培養する。この培養液 1ml を $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む 100ml のM9-CA培地 (0.6% Na₂HPO₄、0.5% KH₂PO₄、0.5% NaCl、0.1% NH₄Cl、0.1mM CaCl₂、2mM MgSO₄、0.5%カザミノ酸、0.2%グルコース) に植え継ぎ、37°Cで培養した。OD₆₀₀ = 0.3 の時に終濃度 $40 \text{mg}/\text{l}$ になるようにインドールアクリル酸を加え、さらに16時間培養した。この培養液を遠心分離して菌体を集めた。

【0047】

菌体に 20ml の緩衝液A [50mM Tris-HCl (pH 8.0)、 1mM EDTA、 30mM NaCl] を加えて懸濁し、再び遠心分離を行なって発現菌体

2. 6 gを得た。得られた菌体を緩衝液A 10ml中に懸濁し、超音波破碎により大腸菌膜を破碎した後に遠心分離を行ない、HCV cDNAでコードされるポリペプチドとTrpEの融合ポリペプチドを含む不溶性画分を得た。その画分に10mlの6M尿素を含む緩衝液Aを加えて融合ポリペプチドを可溶化抽出した。可溶化した抽出物をS-Sepharoseを用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーにかけて、融合ポリペプチドの精製を行なった。

【0048】

実施例2. ハイブリドーマの作製法

前記方法により調製した融合ポリペプチド (TrpC11) を6M尿素溶解後、0.15M NaClを含む10mMリン酸緩衝液 (pH7.3) に終濃度が1.0mg/mlとなるように希釈し、等量のタイターマックスと混和し、TrpC11懸濁液とした。TrpC11濃度が0.01~0.05mg/mlとなるように調製した該懸濁液を4~6週令のBALB/c系マウスに腹腔内投与した。さらに約8週間後、免疫化動物にTrpC11濃度が0.005~0.03mg/mlとなるように調製した生理食塩水溶液を尾静脈内に投与した。

【0049】

最終追加免疫後3日目に、この免疫動物より無菌的に脾臓を摘出し、ハサミで切片としてさらにメッシュを用いて脾臓を個々の細胞にほぐし、RPMI-1640培地で3回洗浄した。8-アザグアニジン存在下で数日間培養し、復帰突然変異体を完全に除いた対数増殖期のマウス骨髓腫細胞株PAIを前記と同様に洗浄後、該細胞 1.8×10^7 個と脾臓細胞 1.0×10^8 個を50ml容の遠心管に入れ混合した。200×g、5分間遠心分離を行ない、上清を除去し、37℃に保温した50%ポリエチレングリコール(PEG)4000(メルク社製)を含むRPMI-1640培地1mlを加えて細胞融合させた。

【0050】

融合細胞は、遠心分離(200×g、5分間)によってPEGを除いた後、96ウエルプレートを用いて、ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジン(以下、HATと省略)を含むRPMI-1640培地中で1~2週間培養してハイブリドーマのみを増殖させた。その後、HATを含まない培地で成育させ、約

2週間後目的の抗体を産生するクローンをELISA法により検索し、所望の反応特異性を有する本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。

【0051】

得られたハイブリドーマについて、常法の限界希釈法に従い、目的とする抗体の産生株の検索および單一クローン化を行ない、得られたハイブリドーマをHC11-14, HC11-10, HC11-3、およびHC11-7と命名した。該4種類のハイブリドーマに関しては、微生物工業技術研究所に平成9年7月4日付でFERM BP-6006, FERM BP-6004, FERM BP-6002及びFERM BP-6003として寄託された。

【0052】

実施例3. モノクローナル抗体の作製法

実施例2に記載の方法により得られたハイブリドーマをブリストン等で処理したマウス腹腔に移植し、腹水中に産生されてくるモノクローナル抗体を取得した。該モノクローナル抗体の精製は、プロテインAを結合させたセファロースカラムによりIgGフラクションを分離した。

【0053】

前記5種類のハイブリドーマから産生されたそれぞれのモノクローナル抗体、C11-14, C11-10, C11-7およびC11-3のアイソタイプは、ウサギ抗マウスIg各アイソタイプ抗体(Zymed社製)を用いた二重免疫拡散法により、C11-10及びC11-7がIgG2a, C11-14及びC11-3がIgG1であることが明らかとなった。得られた4種類のモノクローナル抗体について、HCV・コア領域由来の配列によって合成した20のペプチドを用いてエピトープ解析を行なった結果、表1に示す如くコア領域の一部を特異的に認識するモノクローナル抗体であることがわかった。

【0054】

【表1】

表 1

抗体	認識部位
C11-14	⁴¹ Gly- ⁵⁰ Arg (配列番号4)
C11-10	²¹ Asp- ⁴⁰ Arg (配列番号3)
C11-3	¹⁰⁰ Pro- ¹²⁰ Gly (配列番号5)
C11-7	¹¹¹ Asp- ¹³⁰ Phe (配列番号6)

【0055】

実施例4. 抗原を前処理操作なしで効率的に検出させるための方法

HCVパーティクルを含む検体を界面活性剤を加えた反応液に希釈し、HCVコア抗原の検出される効率を検討した。

なおHCVコア抗原の検出は、HCVコア抗原に対するモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ酵素免疫アッセイ（EIA）で行った。実施例3で得られたモノクローナル抗体のうち、C11-3とC11-7をコア抗原を補足する抗体として用い、C11-10、C11-14を補足されたコア抗原を検出するための抗体として用いた。

【0056】

EIAは基本的には以下の条件で行った。モノクローナル抗体C11-3、C11-7を酢酸緩衝液にそれぞれ4 μ g/mlとなるよう希釈した溶液をミクロダイターブレートに加え、4°C一夜保温した。磷酸緩衝液で洗浄し1% BSAを含む磷酸緩衝液を加えることによるブロッキング操作を施した。そこに反応液100 μ l、検体100 μ lを加え、搅拌後、室温で1.5時間反応させた。低濃度の界面活性剤を加えた磷酸緩衝液で洗浄することにより未反応物を除いた後、アルカリリフォスファターゼで標識したモノクローナル抗体C11-10、C11-14を加え、室温30分反応させた。反応終了後、未反応物を低濃度の界面活

性剤を加えた磷酸緩衝液で洗浄することにより除き、基質液 (CDP-Star / emerald
d11) を加え室温15分反応後、発光量を測定した。

【0057】

一次反応液中に各種界面活性剤を加えその効果を検討した。HCVに対する抗体の力値が検出感度以下であり、ほとんどHCVに対する抗体を含まないと考えられるHCV抗原陽性血清を用いて、発光量の多寡によってコア抗原の検出感度を調べ健常人血清の発光量を1.0として、それに対する反応比率で表わした。結果を次の表2および表3に示す。

【0058】

【表2】

表2

健常人血清に対する各血清の反応比率(S/N ratio)						
	No45	No46	No3	No7	No19	
無 添加	15.67	1.00	1.15	1.34	1.19	
効果判定基準	>30.0	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
添加剤	HLB値	%				
陰イオン性界面活性剤	ドデシル硫酸ナトリウム	40.0	2.5	5.42		
	ドデシル-N-サルコシン酸ナトリウム	0.5	12.79	2.70		
	バーフルオロアルキルカルボン酸S-13 (ASHI GLASS)	0.5	10.55	1.27		
陽イオン性界面活性剤	セチルトリメチルアンモニウムプロミド	0.5	72.97	5.35		
	ドデシルビリジニウムクロライド	2.0	44.55			
	ドデシルトリメチルアンモニウム	0.5	53.43	4.70		
	テトラデシルアンモニウムプロミド	0.5	12.44	2.49		
	n-オクチルトリメチルアンモニウムクロライド	0.5	66.84	4.43		
	CHAPS	0.05	14.69			
界面活性剤	CHAPS	0.5	12.97			
		2.0	11.46			
	バーフルオロアルキルベタインS-32 (ASHI GLASS)	0.5	29.57			
	3-(ドデシルジメチルアミノ)オルホン酸	0.5	25.32			
		2.0	11.97	1.61		
		2.0	13.69	1.46		
				4.57	3.44	5.26

【0059】

【表3】

健常人血清に対する各血清の反応比率(S/N ratio)						
添加	No5	No46	No3	No7	No9	
効果判定基準	15.67	1.00	1.15	1.34	1.19	
添 加 制	>30.0	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
添 加 制	HLB値	%				
非イオン性界面活性剤	MRGA-10	0.5	32.46	3.33	1.97	1.87
	Tween 20	16.7	2.0	16.88		2.84
	Tween 40	15.6	2.0	16.96	1.92	1.64
	Tween 80	15.0	0.5	12.45	1.33	1.23
	Nonidet P-40	13.1	0.5	43.14	3.09	2.95
	オクチルグルコシド	0.5	12.48	0.99	0.90	4.58
	Triton X101	13.4	2.0	25.07	1.92	1.20
	Triton X100	13.5	2.0	26.50	1.85	1.32
	Triton X114	12.4	2.0	34.49	2.23	2.79
	Triton X305	17.3	0.5	25.99	0.94	0.87
	Triton X405	17.9	2.0	22.54	1.30	1.24
その他	ベンジルジメチルエニアルアンモニウム	0.5	5.45	0.99	0.78	1.94
	クロライド	2.0	7.01	1.12		
	トリエチルアミン	0.5	3.89	0.97		
界面活性剤の混合	2%ドテシル-N-サルコシン酸ナトリウム + 2% Triton X100	244.13		6.11	5.50	12.71

【0060】

この結果から、Triton X100に代表されるように、HLB値が12～14間を示す非イオン性界面活性剤の添加により、HCV抗原陽性血清では、健

常人血清と比較して発光量が増大し、検出感度が上昇することが判明した。また、同様にドデシル-N-サルコシン酸ナトリウムやドデシルトリメチルアンモニウムに代表されるように、直鎖アルキル基と第2～第4級アミンを同時にその構造にもつ界面活性剤の添加により、HCV抗原陽性血清における検出感度が上昇することも判明した。炭素数8以下のアルキル基をもつ前記界面活性剤はこのような感度上昇効果は認められなかった。また、これらの2種類の界面活性剤を混合（表2では2%ドデシル-N-サルコシン酸ナトリウムと2%Triton X 100を混合）添加することにより、さらにHCV抗原陽性血清における検出感度が上昇することも判明した。

【0061】

実施例5. HCV感染後のHCV抗体出現前（ウインドピリオド期）の検体中のコア抗原検出

市販セロコンヴァージョンパネルPHV905（B. B. I. inc.）を、反応液中に2%のTriton X 100及び2%のドデシル-N-サルコシン酸ナトリウム添加し、実施例4に準じて測定した。ここで用いたPHV905パネルは、観察開始後21日目（血清No. PHV905-7）に抗HCV抗体検査（オルソEIA. 3.0）で陽転化を示したものであり、その抗体値はカットオフインデックス（S/CO）で表されており、1.0以上が陽性と判定される。HCVコア抗原活性（発光量）は、健常人血清の発光量を1.0として、それに対する比率（S/N）で表した。

【0062】

表4に示したように、まだ抗HCV抗体が陽性となる前にコア抗原活性が認められ、この界面活性剤の添加により、ウイルス粒子からコア抗原性が露呈し、固相化されたモノクローナル抗体と反応し、検出できていることが確認された。

【0063】

【表4】

表 4

血清No.	観察開始後 日 数	HCVコア抗原 活性(S/N)	抗HCV抗体価 (S/CO)
PHV 905-1	0	5.32	0.000
905-2	4	8.30	0.000
905-3	7	15.63	0.000
905-4	11	4.37	0.300
905-5	14	14.75	0.700
905-6	18	7.57	0.700
905-7	21	4.82	2.500
905-8	25	3.31	5.000
905-9	28	1.61	5.000

【0064】

実施例6. 検体中に含まれるHCV抗体の検出とコア抗原との同時検出

HCVエピトープに対する抗体が含まれ、かつHCV抗原がほとんど含まれない検体（ヒト血清）を用いて、界面活性剤を含む一次反応液中でHCVエピトープに対する抗体が失活せずHCVポリペプチドに結合し、2次反応液中に抗ヒト抗体を加えることにより検出可能であること、さらにコア抗原が存在する場合にはコア抗原を検出し、HCVエピトープに対する抗体が含まれるときには抗体を、その両者が含まれ時にはその両者を検出可能であることを、以下の方法により確認した。

【0065】

EIAは基本的には以下の条件で行った。HCVエピトープを含む組換え抗原CEPMを尿素を含む磷酸緩衝液に希釈して、ミクロタイタープレートに添加し、4℃一夜保温する。磷酸緩衝液で洗浄後、プレートにモノクローナル抗体C1

1-3, C11-7を酢酸緩衝液に希釈した溶液を加え、4℃一夜保温した。なお組換え抗原CEPMの作成方法は特願平9-209522に記載されている。抗体溶液を除いた後、磷酸緩衝液で洗浄し1% BSAを含む磷酸緩衝液を加えることによるブロッキング操作を施した。

【0066】

そこにTriton X100, ドデシル-N-サルコシン酸ナトリウム及び尿素を含む一次反応緩衝液100μl、検体100μlを順次加え、攪拌後、室温で1.5時間反応させた。低濃度の界面活性剤を加えた磷酸緩衝液で洗浄することにより未反応物を除いた後、ホースラディッシュペオキシダーゼで標識したHCVコア抗原に対するモノクローナル抗体C11-14と、ヒトIgGに対するマウスモノクローナル抗体を含む2次反応緩衝液を加え、室温30分反応させた。

【0067】

反応終了後、未反応物を低濃度の界面活性剤を加えた磷酸緩衝液で洗浄することにより除き、基質液（オルトフェニレンジアミン）を加え室温2.0分反応後、吸光度を測定した。

HCVコア抗原をほとんど含まないことが確認されているHCV抗体陽性ヒト血清を、ウマ血清により希釈したものを検体として、HCVエピトープに対する抗体が検出されていることを確認したところ、濃度依存的に反応することが確認され、抗体が一次反応液中で失活することなく検出されていることが確認された。

【0068】

【表5】

表5：HCV抗原とHCV抗体の同時測定

		(比較例)	(比較例)	(本発明)
標識抗体：		POD-標識 c11-14	POD-標識 抗ヒトIgG	POD-標識 c11-14と POD-標識 抗ヒトIgG
固 相		c11-3と c11-7	CEPM	c11-3と c11-7と CEPM
サンプル 組換え コア抗原 ng/ml	陽性血清 希釈倍数			
—	—	0.001	0.000	0.000
50	—	2.784	0.000	2.834
12.5	—	2.822	0.000	2.758
3.1	×2048	1.586	0.210	1.341
0.78	×512	0.423	0.539	0.815
0.2	×128	0.085	1.139	1.151
0.048	×32	0.014	1.746	1.621
—	×8	0.000	2.161	1.824

(値は OD492/OD690)

【0069】

一方組換えコア抗原をウマ血清に加え、ウマ血清により希釈したものを検体として、測定したところ濃度依存的に組換えコア抗原が検出できていることが確認された。

コア抗原とヒト血清を適量加えたウマ血清を検体として測定したところ、表4に示すごとく、組換えコア抗原のみを含む場合には組換えコア抗原によるシグナルが得られ、ヒトHCV抗体陽性血清のみを含む場合にはHCV抗体のみのシグナルが得られ、両者を含む場合には両者のシグナルが加算されたシグナルが得られた。故に抗原検出系、抗体検出系の両者が互いに他を干渉しあうことなく機能し、HCV抗原とHCVポリペプチドのエピトープに対する抗体が検出できていることが分かった。

【0070】

実施例7. ヒト血清中の抗原抗体測定法

健常人検体と患者検体、および血清陽転化パネル検体（BBI inc.）を用いて、実施例6に記載した方法に従い抗原と抗体の同時測定を行った。なおパネル血清については、販売元が提供しているHCV抗体検出試薬での判定結果との比較を行った。

健常人検体18例を用いて測定した結果を表6に示すが、健常人には反応しないことが確認された。健常人の分布から、陽性と陰性の判別値を0.1と設定した。

【0071】

表7に示すごとくHCV陽性検体ではいずれも陽性の値を与えた。

一方表8に示すごとく、パネル血清では抗体検査では陽性であることを判別できなかったポイント、1から6の間で陽性判定を与えた。これらのポイントは、Amplicor HCV testの判定結果は陽性判定が与えられており、いわゆるウインドピリオドに相当するが、ウインドピリオドの検体でも陽性判定を与えることが確認された。

【表6】

表 6

検体番号	吸光度
健常人 1	0.063
2	0.057
3	0.066
4	0.025
5	0.045
6	0.063
7	0.047
10	0.033
11	0.036
13	0.037
14	0.030
15	0.028
16	0.031
17	0.040
18	0.051
19	0.052
20	0.031
21	0.053
mean	0.044

【表7】

表 7

患者検体	吸光度
3	2.892 陽性
16	2.335 陽性
45	0.394 陽性
84	2.769 陽性

【表8】

表 8

パネル血清	吸光度	判定	抗体アッセイ	AmpliCor HCV test
PHV907-1	0.557	陽性	陰性	陽性
2	0.397	陽性	陰性	陽性
3	0.357	陽性	陰性	陽性
4	0.224	陽性	陰性	陽性
5	0.192	陽性	陰性	陽性
6	0.247	陽性	陽性	陽性
7	2.414	陽性	陽性	陽性

【0072】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Tonen Corporation

<120> Method for Measurment of hepatitis C virus

<160> 8

<210> 1

<211> 177

<212> PRT

<213> Hepatitis virus

<400> 1

Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Lys Gly Ser Leu Asp Arg Asp Pro Glu

1 5 10 15

Phe Met Gly Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr

20 25 30

Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile Val

35 40 45

Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg

50 55 60

Ala Thr Arg Lys Thr Ser Lys Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg

65 70 75 80

Pro Ile Pro Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro

85 90 95

Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly

100 105 110

Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp

115 120 125

Pro Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr

130 135 140

Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Phe Arg Val Gly Ala Phe

145 150 155 160

Leu Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu

165 170 175

Asp

[0073]

<210> 2

<211> 160

<212> P R T

<213> Hepatitis virus

<400> 2

Met Gly Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn

1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile Val Gly

20 25 30

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala

35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Lys Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Pro

50 55 60

Ile Pro Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro Gly

65 70 75 80

Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly Trp

85 90 95

Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro

100 105 110

Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys

115 120 125

Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Phe Arg Val Gly Ala Phe Leu

130

135

140

Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp

145

150

155

160

[0074]

<210> 3

<211> 20

<212> P R T

<213> A r t i f i c i a l S e q u e n c e

<220>

<223>

<400> 3

Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu

1

5

10

15

Leu Pro Arg Arg

20

[0075]

<210> 4

<211> 10

<212> P R T

<213> A r t i f i c i a l S e q u e n c e

<220>

<223>

<400> 4

Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg

1

5

10

[0076]

<210> 5

<211> 21

<212> P R T

<213> A r t i f i c i a l S e q u e n c e

<220>

<223>

<400> 5

Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg His Arg

1 5 10 15

Ser Arg Asn Val Gly

20

[0077]

<210> 6

<211> 20

<212> P R T

<213> A r t i f i c i a l S e q u e n c e

<220>

<230>

<400> 6

Asp Pro Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Lle Asp Thr Leu

1 5 10 15

Thr Cys Gly Phe

20

[0078]

<210> 7

<211> 24

<212> D N A

<213> A r t i f i c i a l S e q u e n c e

<220> P r o b e

<230> S y n t h e t i c D N A

<400> 7

gaattcatgg gcacgaatcc taaa

24

{0079}

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> Probe

<230> Synthetic DNA

<400> 8

ttagtcctcc agaaccggca c

21

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 HCVの新規な測定方法の提供。

【解決手段】 C型肝炎ウイルス（CHV）の測定方法において、陽イオン性界面活性剤もしくは非イオン性界面活性剤又はその両者の存在下で、CHVコア抗原及びCHVコア抗体をそれらのプローブとの結合により測定することを特徴とする方法。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 390022998

【住所又は居所】 東京都渋谷区広尾一丁目1番39号 恵比寿プライムスクエアタワー

【氏名又は名称】 東燃株式会社

【代理人】

【識別番号】 100077517

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】 石田 敏

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100088269

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】 戸田 利雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所

【氏名又は名称】 西山 雅也

出願人履歴情報

識別番号 [390022998]

1. 変更年月日 1997年 6月17日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都渋谷区広尾一丁目1番39号 恵比寿プライムスクエア
タワー
氏 名 東燃株式会社

